동의신경정신과 학회지 제21권 제2호(2010년 06월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(2):29-44

급성 알코올 중독 어린 흰쥐의 해마 치상회에서 용담추출물이 신경세포생성과 세포사멸에 미치는 영향

이진규, 김이화*, 이재혁

세명대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실, 세명대학교 한의과대학 경혈학교실*

Effect of *Gentianae Radix* on Neurogenesis and Apoptosis in Hippocampus of Ethanol-induced Newborn Rats

Jin-Gyu Lee, E-Hwa Kim*, Jae-Hyok Lee

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Se-Myung University
Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Se-Myung University*

Abstract

Objectives :
The purpose of this study was to investigate the effect of *Gentianae Radix* on neurogenesis and apoptosis in ethanol-induced newborn rats hippocampus dentate gyrus.

Methods :
In vivo, laboratory animals were divided into three groups; Normal group(N), Control group(C) and Treated group (TG)(n=7 for each group). N were treated saline daily for five days. C were treated 1.5 g/㎏ ethanol and saline daily for five days. TG were treated 1.5 g/㎏ ethanol and 300 ㎎/㎏ *Gentianae Radix* daily for five days.
BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine) assay was used to test neurogenesis in the dentate gyrus. And TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assay was used to test apoptosis in the dentate gyrus. Three groups were measured body weight, serum ethanol concentration, BrdU-positive cells and TUNEL-positive cells in the dentate gyrus.
In vitro, MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to test viability in SK-N-MC cells. BrdU assay was used to test neurogenesis in SK-N-MC cells. DNA fragmentation and caspase-3 enzyme activity assay were used to test apoptosis in SK-N-MC cells. And treated ethanol and *Gentianae Radix* of all in vitro tests were made various concentration.

Results :
In vivo, *Gentianae Radix* modulated ethanol-induced neurogenesis and apoptosis in newborn rats hippocampus dentate gyrus. In vitro, TG 100 ㎍/㎖ have significantly modulated ethanol-induced neurogenesis and apoptosis in SK-N-MC cells. And only TG 100 ㎍/㎖ have significantly protected SK-N-MC cells from ethanol-induced cytotoxicity.

Conclusions :
Gentianae Radix may have the effect that modulated ethanol-induced neurogenesis and apoptosis in SK-N-MC cells.

Key Words :
Gentianae Radix, Alcohol, Neurogenesis, Apoptosis, Hippocampus, Dentate Gyrus

투고 : 2010. 5. 8. 수정 : 2010. 6. 3. 채택 : 2010. 6. 3.
교신저자 : 이재혁, 충북 충주시 봉방동 836 세명대학교 충주한방병원 한방신경정신과
Tel) 043-841-1736, Fax) 043-856-6295, E-mail) yuean69@hanmail.net
이 논문은 2010년 2월 세명대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

급성 알코올 중독은 과량의 알코올을 단시간 내에 급속히 섭취하여 신체적, 정신적 변화를 겪게 되는 것을 말한다[1]. 알코올에 의한 급성 독성은 GABA-A 수용체에서 GABA의 신경억제작용을 증가시키며, 알코올은 glutamate 수용체 중 학습과 기억 등의 인지기능에 영향을 미치는 NMDA 수용체의 cation channel을 억제하는 작용을 한다[2].

알코올의 독성에 의한 뇌병변에 대해서는 뇌위축[3], 신경퇴행성 질환[4], 세포막 기능 변성[5], 뇌유전자 발현 변화[6]에 관한 연구가 있으며 그 중에서도 알코올이 해마 치상회에 미치는 영향에 대한 연구[7,8,9]가 활발히 진행되고 있다.

변연계(limbic system)의 한 부분인 해마(hippocampus)는 기억, 감정 및 공격성의 기능을 담당한다. 해마의 구조 중 치상회(dentate gyrus)는 해마이행체(subicular complex) 및 측두엽의 일부와 함께 해마형성체(hippocampal formation)를 이루며 기억, 감정, 동기에 관련되어 있다[1]. 해마 치상회는 특히 새로운 신경세포의 생성이 지속적으로 이루어지는 곳이므로 신경손상을 평가할 수 있는 중요 부위이다[10].

알코올 과잉 섭취에 의한 질환을 한의학에서는 酒傷證이라고 하여 한의학적 이론에 근거한 다양한 연구가 이루어져 왔다[11,12,13]. 한의학적으로는 알코올을 과잉 섭취하게 되면 濕熱과 火로 인해 정신을 손상시키고 精血을 소모시키는 酒傷의 상태에 이르게 되며[14], 치료법으로는 發汗利小便 去濕熱을 기본으로 한다[15].

이번 연구에서 酒傷證의 치료 약물로 선정한 龍膽草(*Gentianae Radix*)는 Gentiopicrin, Gentianine, Gentianose 등의 성분이 함유되어 간장보호 및 담즙분비효과, 혈압강하, 진통, 항염증 작용 등을 나타낸다[16]. 한의학적으로는 苦寒하여 淸熱燥濕, 瀉肝膽火의 효능으로 濕熱黃疸, 濕疹瘙痒, 驚風抽搐 등의 치료에 응용되고 있다[17]. 이러한 효능이 濕熱, 火로 대표되는 酒傷證의 치료에 응용될 수 있을 것으로 사료되나, 최근 용담초에 관한 연구로는 항염증 작용[18]과 담석 치료[19] 외에 알코올로 인한 질환에 관한 연구는 찾아볼 수 없었다. 이에 저자는 알코올과 관련된 신경계 질환에 대한 용담초의 효능을 알아보고자, 급성 알코올 중독을 유발시킨 어린 흰쥐에게 용담초 추출물을 처치하여 해마 치상회 부위를 중심으로 신경세포분화와 신경세포사멸에 나타나는 변화를 연구하였다. 또한 세포배양액을 이용한 실험을 통하여 용담초의 에탄올 중독에 대한 중추신경계 손상 방지 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험 방법

1. 재료

1) 실험동물

(주)오리엔트 바이오(경기 성남, Korea)에서 1일령 Sprague-Dawley계 rat을 구입하여 9일간의 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 전 실험기간 동안 어미의 모유수유를 통해 영양을 공급받았으며, 온도 20±2℃, 습도 50±5%, 밤낮주기(12시간 light/12시간 dark)로 조정된 환경에서 사육하였다.

2) 세포 배양

실험에 사용된 Human neuroblastoma cell line (SK-N-MC)은 (주)한국세포주은행(서울, Korea)에

서 분양받았으며, 10% Fetal Bovine Serum(Lonza, USA)과 1% Anti-biotic(Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(Lonza, USA)을 이용하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

3) 약재

실험에 사용한 용담초(*Gentianae Radix*)는 한의유통(경기 포천, Korea)에서 구입한 것을 엄선하여 사용하였다. 용담초 300 g을 증류수 3 ℓ에 넣고 2시간 100℃로 열탕하여 추출한 후 상층액을 여과지로 2회 여과하고 이 여과액을 Rotary evaporator (EYELA, Japan)를 이용하여 농축하고 -80℃에서 동결시킨 후 Freezer dryer system(Labconco, USA)을 이용하여 건조시켜 최종적으로 46 g의 분말을 얻었다.

2. 실험 방법

1) In vivo

(1) 실험군

적응 기간이 지난 후 rat의 체중을 측정하여 각 군의 평균 체중이 유사하도록 다음과 같은 세 군으로 분류하였다.

정상군(N, n=7) : 식염수를 복강주사한 군.

대조군(C, n=7) : 1.5 g/㎏ 용량의 Ethanol과 식염수를 복강주사한 군.

용담초 처치군(TG, n=7) : 1.5 g/㎏ 용량의 Ethanol과 300 mg/㎏ 용량의0 용담초를 복강주사한 군.

(2) 약물 투여

정상군을 제외한 대조군과 용담초 처치군에 Ethanol을 실험 시작일(0일)부터 실험 종료일(4일)까지 매일 1.5 g/㎏의 농도로 총 5회 복강 주사하였으며, 정상군에는 동량의 식염수를 복강주사하였다. 또한 용담초 처치군에는 용담초 분말을 식염수에 녹여 300 mg/㎏의 용량으로 매일 총 5회 복강주사 하였으며, 정상군 및 대조군에는 동량의 식염수를 주사하였다.

(3) BrdU 주사

실험 종료일에 rat의 희생 2시간 전 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU; Sigma, USA)을 모든 군에 100 ㎎/㎏의 농도로 복강 주사하였다.

(4) 체중 측정

실험 시작일과 실험 종료일에 rat의 체중을 측정하여 체중의 변화를 관찰하였다.

(5) 혈중 에탄올 농도 분석

혈액은 실험 종료일에 ether 마취 하에서 심장 채혈하였으며 3,000 rpm에 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 Ethanol assay kit(Roche, Germany)를 이용하여 혈중 알코올 농도 분석을 시행하였다.

(6) 뇌조직 처리

실험 종료일에 ether 마취 하에서 rat의 흉강을 열고 좌심실을 통하여 50 mM phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)을 주입한 후 4% paraformaldehyde 고정액을 관류하였다. 관류 고정 후 뇌를 적출하고 4% paraformaldehyde 고정액에 담아서 하룻밤 동안 침전시킨 후 고정을 실시하였다. 고정된 뇌조직은 동결방지를 위해 15% sucrose 용액과 30% sucrose 용액으로 순차적으로 옮긴 후 Microtome(Leica, Germany)을 이용하여 30 ㎛ 두께의 연속관상절편을 제작하였다.

(7) BrdU 면역조직화학염색

해마 치상회(dentate gyrus)의 새로운 세포 생성을 조사하기 위하여 BrdU 면역조직화학법을 실시하였다. 대천문에서 3.30±20 mm 거리의 해마 배측면에서 절편을 취하여 50 mM PBS(pH 7.4)로 10분 간 세척한 후 2 N HCl에 넣고 37℃에서 1시간 반응시키고, 100 mM borate buffer (pH 8.5)로 30분간 세척하였다. 다시 조직절편들을 50 mM PBS(pH 7.4)로 10분간 세척한 후에 1:600으로 희석된 Anti-bromodeoxyuridine(Roche, Germany)에 넣고 4℃에서 12시간 이상 반응시켰다. PBS로 10분간 세척 후 1:200로 희석된 Biotinylated mouse monoclonal antibody(Vector Laboratories, USA)와 1시간 동안 반응시키고 10분간의 PBS 세척을 거쳐 ABC working solution (Vector Laboratories, USA)에서 1시간 동안 반응시켰다. nickel chloride(40 mg/㎖)를 함유하는 0.02% 3.3′-diaminobenzidine(DAB), 50mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% 과산화수소를 혼합한 용액에 5분간 반응시켜 발색시켰으며, Hematocylin으로 대조염색을 시행한 후 gelatin-coating된 slide에 mounting하였다.

(8) TUNEL 염색

TUNEL염색은 In situ cell death detection kit (Roche, Germany)를 이용하여 다음과 같이 시행하였다. (7)에서 절편한 뇌조직절편을 PBS로 충분히 세척한 후 gelatin-coated slide에 붙여 15분간 공기 중에서 건조시키고, 3% 과산화수소를 포함하는 methanol에 10분간 담가 두었다. 조직절편을 PBS로 10분간 세척하고 0.1% triton X-100, 0.1% sodium citrate 혼합액에 넣고 4℃에서 2분간 방치한 후 다시 PBS로 세척하고 Reaction mixture를 넣어 37℃에서 1시간 방치하였다. PBS로 세척하고 converter-POD를 넣은 후 다시 37℃에서 30분 방치하였으며, PBS로 세척 후 10분간 DAB 발색을 시행하고 hematocylin으로 대조염색하였다.

(9) 조직 관찰

해마 치상회 영역에서 면역반응이 일어난 세포들을 광학 현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

2) In vitro

(1) MTT assay

SK-N-MC cell을 24well plate에 5.0×10^5 cells/well로 분주하고 4시간 후에 에탄올을 1000 mM, 500 mM, 100 mM, 50 mM, 10 mM, 0 mM 농도로 각각 처치하였다. 또한 에탄올로 인한 세포독성에 대한 용담초의 억제효과를 알아보기 위해 100 mM 에탄올 처치와 동시에 용담초를 각각 10 ㎍/ml, 50 ㎍/ml, 100 ㎍/ml의 농도로 처치하였다. 에탄올과 용담초의 처치 6시간 후에 MTT labeling reagent(Roche, Germany)를 넣고 4시간 동안 Incubation하였다가 배지를 완전히 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣어 세포를 녹인 후 ELISA reader(BIO-tek, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) BrdU assay

에탄올과 용담초가 신경아세포의 신생에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Cell proliferation ELISA, BrdU kit(Roche, Germany)를 이용하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 96well plate에 SK-N-MC cell을 7.5×10^4 cells/well로 분주하고 4시간 후에 에탄올과 용담초를 각각 농도별로 처치하고 동시에 10 μM의 농도로 BrdU를 처치한 후 2시간 동안 incubation하였다. 2시간 후 배지를 제거하고 FixDenat solution을 200 ㎕/well로 넣어 상온에서 30분간 방치한 후 다시 FixDenat solution

을 제거하고 100 ㎕/well로 anti-BrdU-POD working solution을 넣은 후 상온에 90분간 두었다. Washing solution으로 3회 plate를 세척하고 100 ㎕/well의 substrate solution을 넣은 다음 10분 후에 ELISA reader(BIO-tek, USA)를 이용하여 370 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) DNA fragmentation

ApopLadder kit(Takara, Japan)를 이용하여 다음과 같이 DNA fragmentation assay를 시행하였다. SK-N-MC cell을 6 well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하고 4시간 후 에탄올과 용담초를 농도별로 처치하여 incubation 하였다. 6시간 후 PBS를 넣고 micro tube에 cell을 모아 1,600×g로 5분간 원심분리하고, 상층액을 제거한 다음 lysis buffer 100 ㎕를 넣고 1,100×g로 5분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담았다. 10% SDS solution과 enzyme A를 각각 20 ㎕씩 가한 후 56℃에서 1시간 incubation 시킨 후 다시 enzyme B를 20 ㎕ 넣고 37℃에서 1시간 incubation한 다음 Precipitant 130 ㎕를 넣고 에탄올을 950 ㎕ 가한 후 -20℃에서 보관하였다. 다음날 5℃에서 12,000×g로 15분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80%에탄올을 가하여 pellet을 세척하고 5℃에서 12,000×g로 15분간 다시 1회 원심분리한 후 공기 중에서 건조시켜 에탄올을 제거하였다. TE buffer 30 ㎕를 넣어 pellet을 녹인 후 37℃에 10분간 incubation하였다가 Ethidium bromide(EtBr)가 포함된 2% agarose gel에 100 V에서 30분 전기영동한 후, UV로 관찰하였다.

(4) Caspase-3 enzyme activity assay

Apoalert® caspase-3 assay kit(Clontech, USA)를 이용하여 caspase-3 친화성 기질에서 유리된 p-nitroaniline(pNA)을 측정하는 방법을 통해 caspase-3 enzyme activity를 측정하였다. SK-N-MC cell에 에탄올과 용담초를 농도별로 처치하고 4시간 후 cell 수를 세어 2×10^6개가 되도록 모아 400×g에서 5분간 원심분리하고, 상층액을 제거한 후 차가운 lysis buffer를 50 ㎕ 넣어 얼음 속에서 10분간 incubation시켰다. 4℃에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거한 다음, caspase-3 substrate를 5 ㎕ 가하여 37℃에서 1시간 incubation하고 ELISA reader(BIO-tek, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 통계 처리

실험결과는 SPSS Window program(Ver. 12.0)을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값 ± 표준편차(Mean ± SD)로 나타내었고, 통계적 유의성은 $p<0.05$로 설정하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 사후 검정으로 Tukey test를 실시하였다.

Ⅲ. 실험 성적

1. In vivo

1) 체중 변화

실험 시작일(0일)에 정상군과 대조군, 용담초 처치군의 체중은 각각 25.0±0.6 g, 24.9±1.0 g, 25.0 ±0.7 g 이었으며, 실험 종료일(4일)의 체중은 각각 30.3±0.5 g, 29.8±0.9 g, 30.0±0.9 g로 증가하였는데, 체중 증가폭에 있어 각 군별로 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다(Fig. 1).

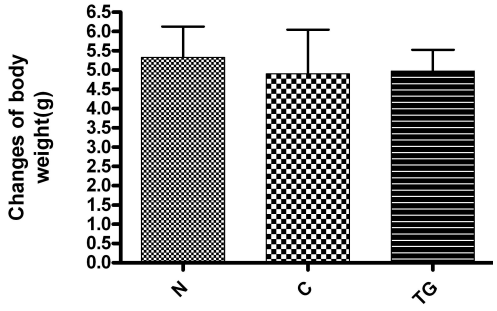


Fig. 1. Changes of body weight.
N : Saline treated group
C : 1.5 g/㎏ Ethanol and Saline treated group
TG : 1.5 g/㎏ Ethanol and 300 ㎎/㎏ *Gentianae Radix* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=7)

2) 혈중 에탄올 농도

정상군에서 혈중 에탄올은 거의 검출되지 않았으며(2.28±1.97 ㎎/ℓ), 대조군(112.30±12.80 ㎎/ℓ)과 용담초 처치군(108.14±11.11 ㎎/ℓ)에서는 혈중 에탄올 농도가 정상군에 비해 현저히 증가했으나, 대조군과 용담초 처치군 간의 혈중 에탄올 농도의 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

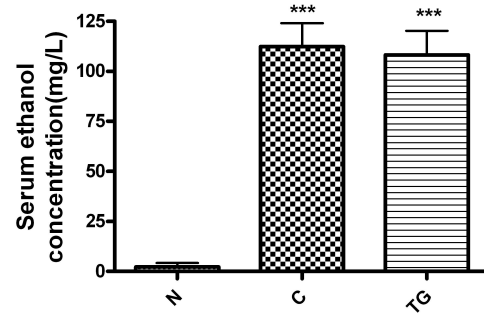


Fig. 2. Serum ethanol concentration.
N : Saline treated group
C : 1.5 g/㎏ Ethanol and Saline treated group
TG : 1.5 g/㎏ Ethanol and 300 ㎎/㎏ *Gentianae Radix* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=7)
*** : Statistically significant difference from the N group, as determined by the Tukey test as $p<0.001$

3) 해마 치상회에서의 세포 생성에 미치는 영향

해마 치상회 영역에서의 세포 생성은 정상군(55.14±8.47 cells)에 비해 대조군(35.86±4.74 cells)과 용담초 처치군(40.29±12.96 cells)에서 통계적으로 유의한 감소를 보였다. 용담초 처치군에서는 대조군에 비해 해마 치상회에서의 세포 생성이 증가되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

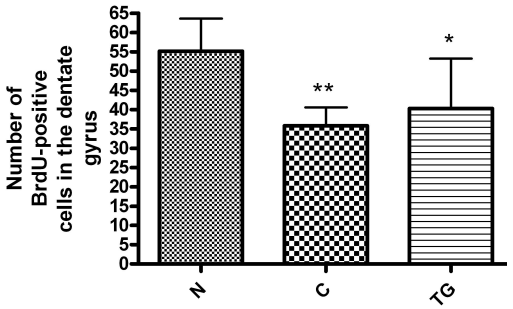


Fig. 3. BrdU-positive cells in the dentate gyrus.
N : Saline treated group
C : 1.5 g/㎏ Ethanol and Saline treated group
TG : 1.5 g/㎏ Ethanol and 300 ㎎/㎏ *Gentianae Radix* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=7)
* : Statistically significant difference from the N group, as determined by the Tukey test as $p<0.05$
** : Statistically significant difference from the N group, as determined by the Tukey test as $p<0.01$

4) 해마 치상회에서 세포 사멸에 미치는 영향

TUNEL 염색결과 해마 치상회에서 apoptosis가 일어난 세포의 수는 정상군, 대조군, 용담초 처치군에서 각각 56.71±17.40 cells, 251.29±47.99 cells, 223.14±58.11 cells로 대조군과 용담초 처치군에서 정상군에 비해 증가하였다. 또한 용담초 처치군에서 대조군에 비해 상대적으로 apoptosis가 일어난 세포 수가 적었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

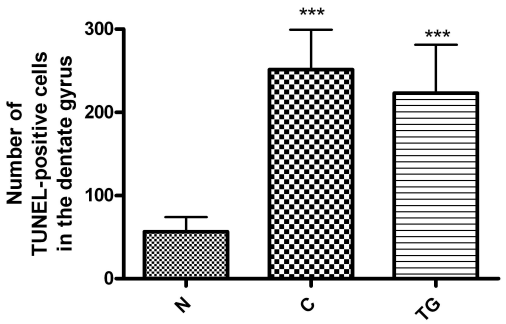


Fig. 4. TUNEL-positive cells in the dentate gyrus.
N : Saline treated group
C : 1.5 g/㎏ Ethanol and Saline treated group
TG : 1.5 g/㎏ Ethanol and 300 ㎎/㎏ *Gentianae Radix* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=7)
*** : Statistically significant difference from the N group, as determined by the Tukey test as p<0.001

2. In vitro

1) MTT assay

SK-N-MC cell에 대한 에탄올의 독성은 농도별로 다음과 같았다. 에탄올을 처치하지 않은 군(control)의 생존률을 100%로 했을 때, 에탄올을 10 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM, 1000 mM의 농도로 처리했을 때의 생존률은 각각 90.4±3.1%, 82.9±1.6%, 66.8±4.5%, 52.3±4.9%, 19.0±0.8%와 같았다. 또한 100 mM 농도의 에탄올과 함께 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖의 용담초를 투여한 군의 생존률은 각각 69.0±2.1%, 72.3±4.2%, 77.3±3.6% 이었으며, 100 mM의 에탄올만을 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 독성을 억제하는 경향을 나타내었다. 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 용담초 처치군에서는 100 mM 에탄올 처치군과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았으나, 100㎍/㎖의 용담초를 투여한 군에서는 100mM 에탄올 처치군과 통계적으로 유의한 차이($p<0.05$)를 나타내었다(Fig. 5).

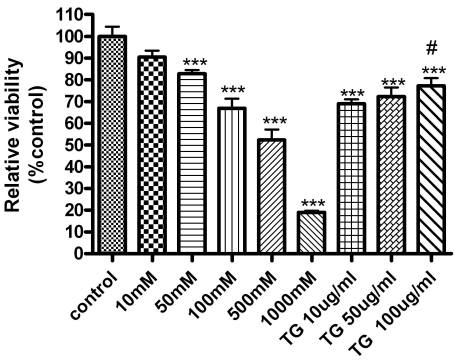


Fig. 5. Protective effects of *Gentianae Radix* on the ethanol-induced cytotoxicity.
control : 0 mM Ethanol treated group
10 mM : 10 mM Ethanol treated group
50 mM : 50 mM Ethanol treated group
100 mM : 100 mM Ethanol treated group
500 mM : 500 mM Ethanol treated group
1000 mM : 1000 mM Ethanol treated group
TG 10 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 10 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
TG 50 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 50 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
TG 100 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 100 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=3)
*** : Statistically significant difference from the control group, as determined by the Tukey test as p<0.001
# : Statistically significant difference from the 100 mM group, as determined by the Tukey test as p<0.05

2) 신경아세포의 신생에 미치는 영향

에탄올 0 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM, 1000 mM 농도에서 각각의 흡광도는 1.271±0.052, 1.210±0.065, 1.110±0.120, 0.930±0.003, 0.865±0.035, 0.767±0.021로 에탄올의 농도가 높아질수록 SK-N-MC cell의 생성은 감소하였다. 한편 100 mM의 에탄올과 함께 용담초를 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖로 처리한 군에서는 각각 0.963±0.016, 0.979±0.018, 1.096±0.081로 100 mM의 에탄올만 처리한 군에 비해 세포 생성이 증가하는 경향을 나타내었다. 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖의 용담초 처치군에서는 100 mM 에탄올 처치군과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았으나, 100 ㎍/㎖

의 용담초를 투여한 군에서는 100 mM 에탄올 처치군과 통계적으로 유의한 차이($p<0.05$)를 나타내었다(Fig. 6).

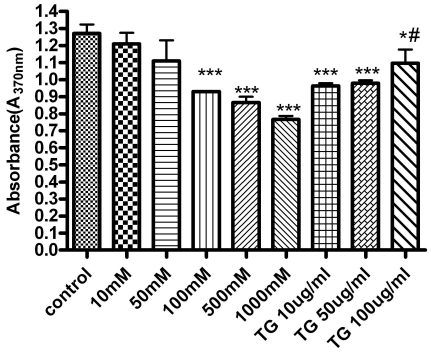


Fig. 6. Effects of ethanol and *Gentianae Radix* on the neurogenesis in SK-N-MC cells.
control : 0 mM Ethanol treated group
10 mM : 10mM Ethanol treated group
50 mM : 50 mM Ethanol treated group
100 mM : 100 mM Ethanol treated group
500 mM : 500 mM Ethanol treated group
1000 mM : 1000 mM Ethanol treated group
TG 10 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 10 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
TG 50 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 50 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
TG 100 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 100 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=3)
* : Statistically significant difference from the control group, as determined by the Tukey test as $p<0.001$
*** : Statistically significant difference from the control group, as determined by the Tukey test as $p<0.001$
# : Statistically significant difference from the 100 mM group, as determined by the Tukey test as $p<0.05$

3) DNA fragmentation

SK-N-MC cell에 에탄올을 처리한 결과 DNA loading 시 나타나는 apoptosis 특유의 ladder 형태가 잘 관찰되었으며, 에탄올과 함께 용담초를 같이 투여하였을 때는 ladder 형태가 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

4) Caspase-3 효소 활성에 미치는 영향

caspase-3 친화성 기질에서 유리된 pNA의 양을 측정하는 방법을 통해 caspase-3의 활성을 간접적으로 측정하였다. 100 μM의 에탄올을 처치한 군(17.73±4.42 nmol)에 비해 에탄올과 용담초 10 ㎍/㎖을 동시에 처치한 군(17.92±2.00 nmol)에서 근소하게 pNA의 양이 상승하였으나, 용담초 50 ㎍/㎖를 처치한 군(15.39±2.21 nmol)과 용담초 100 ㎍/㎖를 처치한 군(14.18±2.95 nmol)에서는 에탄올만 처치한 군에 비해 통계적으로 유의한 차이는 없었으나($p>0.05$) 상대적으로 pNA의 양이 감소하였다(Fig. 8).

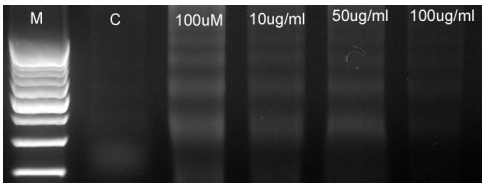


Fig. 7. DNA fragmentation assay.
M : 100 bp DNA ladder
C : 0 mM Ethanol treated group
100 mM : 100 mM Ethanol treated group
10 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 10 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
50 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 50 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
100 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 100 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group

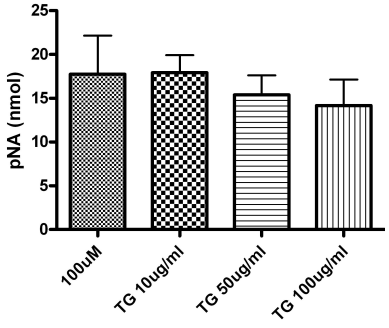


Fig. 8. Caspase-3 activity.
100 mM : 100 mM Ethanol treated group
TG 10 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 10 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
TG 50 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 50 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
TG 100 ㎍/㎖ : 100 mM Ethanol and 100 ㎍/㎖ *Gentianae Radix* treated group
Values are represented as mean ± SD.(n=3)

Ⅳ. 고 찰

급성 알코올 중독은 알코올의 섭취에 의해서 생체가 정신적, 신체적 영향을 받아 기능이 일시적으로 장애되는 상태로서[1] 다행감, 체위성안진, 협조운동장애, 뇌파변화, 건망, 혼수 등의 증상이 나타나며 그 양상은 혈중 알코올 농도, 알코올 감수성, 섭취시의 조건 등에 따라 달라진다[20].

알코올의 대사는 다양한 경로로 이루어지며 위장에서부터 시작된다. 위장에서는 알코올 농도가 높을 때 대사가 활성화되어 섭취한 알코올의 약 25%까지 분해될 수 있으나, 보통 섭취한 알코올의 90%는 간세포 세포질에서 대사된다. 이 과정에서 알코올의 분해효소(alcohol dehydrogenase, ADH), cytochrome P-450, catalase 등이 작용하여 아세트알데히드(acetaldehyde)로 변환된 후 아세테이트(acetate)로 대사되며[21], 알코올 중간 대사산물인 아세트알데히드와 알코올 대사시 발생하는 산소자유기(oxygen free radical)가 독성을 나타낸다. 이때 알코올 대사에 의해 체내에서 lactic acid, uric acid가 증가하는데 이들은 각각 불안발작, 통풍을 일으킨다. 이와 더불어 lipoprotein과 triglyceride는 대사 장애를 야기하여 지방간, 간염, 간경화를 유발하고 혈압상승, 심박출량 증가, 빈맥, 산소소모량 증가, 근혈 기능장애를 일으킨다. 그밖에 위염, 설사, 위궤양, 췌장염, 당대사 장애, 심근병증, 혈소판 감소, 빈혈, 근병증, 성기능장애, 수태능력 장애 등 다양한 합병증이 나타난다[1].

알코올이 신경계에 미치는 영향은 지각, 판단, 분별, 학습 및 사고 등에 장애를 일으키며, 가벼운 증상에서부터 사망과 직결되는 질환까지 다양한 병변을 초래하게 된다[22].

알코올은 뇌의 다양한 부위에 작용하여 독성을 나타내며 혈중농도에 따라 다양한 증상을 일으키게 되는데 경증의 경우 집중력 곤란, 흥분, 기억력 저하, 혼동, 방향감각 상실 등에 그치지만 중증의 경우 혼수상태에 빠지거나 호흡중추 억제로 사망할 수도 있다[22]. 급성 알코올 중독에서는 병적중독(Pathologic intoxication)이 일어날 수 있으며 급작스러운 흥분, 비합리적이고 격한 행동, 망상, 환각 등이 나타난다. 또 알코올에 의한 기억상실(Alcoholic blackouts)이 일어날 수 있는데, 과량의 술을 빨리 마시는 경우에 자주 나타나며 부분적인 또는 완전한 기억 상실을 경험하게 된다[23]. 이는 혈중 알코올 농도가 높아진 결과 해마와 관련된 기억회로의 일시적 장애로 새로운 기억 입력이 이루어지지 않기 때문이다[24]. 또한 급성 알코올 중독에서는 알코올에 의해 이차적으로 포도당신생합성(gluconeogenesis) 장애가 일어나 혼수에 빠지게 되는 알코올성 저혈당혼수(Ethanol-induced hypoglycemic coma)가 나타날 수 있다[22].

알코올의 독성으로 인한 또다른 주요 질환은 뇌손상이다. 알코올은 중추신경계에 대한 비특이적 억제제로서 기억, 인지, 판단, 주의, 정보처리 등의 사고기능과 반응시간, 운동조화, 언어 등의 운동기능에 장애를 야기한다[1].

알코올이 뇌손상에 미치는 영향에 대해서는 여러 연구보고들이 있는데, 에탄올의 정맥 투여시 호흡 억제를 유발하고 뇌혈류량 증가로 뇌압을 상승시키게 되며[25], NMDA 수용체에 독성작용을 유발하여 신경세포 사멸을 증가시키고[26], 또한 알코올의 투여 초기에는 세포자멸사가 유발되며, 장기투여시 대뇌의 변화 외에 소뇌 purkinje cell의 소실을 일으키게 된다[27]고 하였다. 이 외에 알코올이 간접적으로 영양결핍을 일으켜 뇌의 정상적인 기능에 장애를 유발하기도 한다[22]. 알코올이 뇌에 미치는 영향의 하나로 기억상실

(blackout)이 있는데 이는 단기기억 손상 위주의 전향적 기억상실이며, 이러한 기억의 형성과 회상에 관련된 중요 부위로 해마가 있다[1].

해마는 기억, 감정 및 공격성의 기능을 담당한다. 해마의 구조 중 치상회는 해마이행체 및 측두엽의 일부와 함께 해마형성체를 이루며 기억, 감정, 동기에 관련되어 있다[1,28]. 기존에는 출생 후 뇌 신경세포의 새로운 생성은 이루어지지 않는다는 것이 일반적인 학설이었으나, 근래에는 포유동물이 성숙한 이후에도 해마를 포함한 특정영역에서는 뇌신경세포들이 지속적으로 생성된다고 보고되고 있다[29,30,31]. 새로운 신경세포의 생성은 증식, 생존, 분화의 과정을 거치게 되는데 신경전구세포는 해마 치상회의 과립세포하영역에 존재하면서 분화되어 신경세포를 생성하게 되므로[30], 해마 치상회는 신경세포의 생성, 사멸 실험에 유용한 부위라 할 수 있다.

알코올 관련 질환에 대한 한의학적 이론으로서 『靈樞』[32]에서는 술의 성질에 대해 "酒者 水穀之精 熟穀之液也 其氣慓悍 其入于胃中 則胃脹氣上逆 滿於胸中 肝浮膽橫"이라 하였고, 이러한 술의 특성은 風寒의 침습을 막고 氣血의 흐름을 활발하게 하며 邪氣를 제거하고 약의 효능을 이끌어 주는 기능이 있지만 大熱有毒하여 정서를 혼란시켜 변화시키기도 한다[33]. 한의학적으로는 알코올을 과잉 섭취하게 되면 濕熱이 쌓이고, 火가 動하게 되어 정신을 손상시키고 精血을 소모시키는 酒傷의 상태에 이르게 된다[14].

酒傷證이란 음주로 인하여 발생되는 모든 질환을 의미하는 것으로 『東醫寶鑑』[33]에서는 "其始也病淺 或嘔吐 或自汗 或瘡痍 或鼻瘡 或自泄 或心脾痛 尙可發散而去之 及其久而病深 則爲消渴 爲黃疸 爲肺痿 爲內痔 爲鼓脹 爲失明 爲哮喘 爲勞嗽 爲癲癎 爲難明之疾 倘非具眼 未易處治 可不謹乎"라 하여 술로 인한 질환이 다양한 증후 및 합병증을 일으킨다고 하였고, "若醉飮過度 盆傾頭暈 毒氣攻心 穿腸腐脇 神昏錯謬 目不見物 此則喪生之本也"라 하여 알코올이 신경계 질환, 기질성 소화기 질환, 정신 장애를 일으킬 수 있다고 하였다. 『素問』[32]에서는 "酒入於胃 則絡脉滿而經脉虛 脾主爲胃行其津液者也 陰氣虛 則陽氣入 陽氣入 則胃不和 胃不和 則精氣竭 精氣竭則不營其四支也"라 하여 음주로 인해 소화 및 영양 장애에 이를 수 있다고 하였고, 이는 알코올이 간접적으로 영양결핍을 일으켜 뇌의 정상적인 기능에 장애를 줄 수 있음을 시사하는 것이다. 한의학에서도 腦는 淸靈之臟, 純陽之臟, 喜盈惡虧, 喜靜惡擾, 宜伸忌鬱의 특성을 가진 臟腑로서[14] 단순한 奇恒之腑가 아니라, 정신활동과 관련된 주요한 臟腑인 心의 神明기능이 외부로 표출된 臟腑로 이해해야 한다[34]. 酒傷證으로 인한 濕熱, 火의 병리가 腦를 濁하게 하며, 純陽의 상태를 더욱 熏蒸하여 요동시키고 鬱滯하게 하여 기능 장애를 유발하게 된다. 또한 기억력 장애를 의미하는 健忘은 心脾虛損, 心腎不交, 精竭神衰, 痰瘀痺阻 등의 병리로 발생하는데 心, 脾, 腎, 腦와 관계가 깊으며 특히 腦를 營養하지 못할 때 나타난다[14]. 이 역시 濕熱, 火에 의해 精血이 소모되고 濕痰, 瘀血이 발생하여 神志활동을 저해할 경우 발생하며 알코올로 인한 이차적인 영양 장애로 뇌기능이 저하되는 기전과 일맥상통한다.

酒傷證의 治法으로는 發汗 利小便 上下分消其濕 淸熱을 기본으로 한다[14]. 처방은 원인에 따라 과음시에는 葛花解醒湯, 酒蒸黃連丸, 百杯丸, 對金飮子, 解酒化毒散, 葛黃丸, 升麻葛根湯, 酒傷으로 두통, 구토, 현훈 발생시에는 補中益氣湯加減, 對金飮子加味, 酒傷으로 熱毒 발생시에는 防風通聖散加味, 煩渴 발생시에는 五豆湯, 만성 음주자의 淸熱 調理脾胃에 小調中湯, 취한 뒤에 入房으

로 병들 경우 人參散, 蓄血 胃口作痛에는 大調中湯, 八物湯加味 등의 처방을 사용하고 治法으로는 땀을 내고 소변을 利하게 하며 上下로 濕을 分消하며 淸熱하는 방법으로 치료하게 된다[33,35].

酒傷證 관련연구로서 오[35]는 『東醫寶鑑』에 수록된 23개의 酒傷 치료처방과 구성약물을 조사하여 처방의미를 도출하였고, 곽 등[12]은 흰쥐 실험을 통해 에탄올에 의한 간조직중의 glutathione 감소, 혈청중의 간효소 수치 증가에 淸肝散이 억제 효과가 있으며 ADH 활성을 증가시킬 수 있다고 보고하였다. 그리고 김 등[36]은 흰쥐 실험에서 알코올로 인한 고지혈증과 간손상에 酒傷證 치료 처방인 韓茵薩蒿湯을 사용하여 유의한 치료 효과를 관찰하였다.

본 연구에서 酒傷證의 치료 약물로 선정한 용담초는 용담과 식물 용담 혹은 삼화용담의 뿌리 및 뿌리줄기이며 Gentiopicrin, Gentianine, Gentianose 등의 성분이 함유되어 간장보호 및 담즙분비효과, 혈압강하, 진통, 항염증 작용 등을 나타낸다. 용담초는 苦寒하여 肝膽의 實火를 瀉하고 下焦의 濕熱을 제거하는 효능이 있어 肝經熱盛, 痙癇狂躁, 頭痛, 目赤, 咽喉痛, 黃疸, 熱痢, 癰腫瘡癤, 陰囊腫痛, 陰部濕癢 등[16] 肝膽의 實火로 나타나는 肝陽上亢, 肝火上炎, 膽熱證 병리에 의한 神志질환 및 下焦濕熱 질환에 사용할 수 있다.

용담초 관련 연구로서 서[37]는 항산화 검색법으로 광범위하게 쓰이는 DPPH radical scavenging activity 실험을 통해 용담초 추출물의 항산화 효과를 입증하였고 김[18]은 용담초 MeOH 추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 NO의 생성, iNOS 및 COX-2의 발현, cytokine의 level에 미치는 영향을 검토하여 염증질환, 면역질환의 조절에 효과가 있음을 보고하였다. 또 한[38]은 CCl_4로 흰쥐의 간을 손상시키고 용담초 약침을 처치하여 간손상을 회복시키는 효과가 있음을 보고하였으며, 문[19]은 용담초 약침을 담석의 치료에 응용할 수 있다고 하였다. 이와 같이 용담초에 관한 다양한 연구들이 있었으나 알코올로 인한 질환의 치료에 관한 것은 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 용담초가 淸熱燥濕, 瀉火의 효능이 있어 濕熱, 火로 대표되는 酒傷證의 치료에 응용할 수 있을 것이라는 가설 하에, 알코올 관련 질환 치료에 있어서의 용담초 효능에 대하여 실험을 실시하게 되었다.

실험 절차로는 급성 알코올 중독을 유발시킨 어린 흰쥐에게 용담초 추출물을 처치하여 해마 치상회 부위를 중심으로 신경세포분화와 신경세포사멸에 나타나는 변화를 연구하였으며, 또한 세포배양액을 이용한 실험을 통하여 용담초의 에탄올 중독에 대한 중추신경계 손상 방지 효과를 관찰하였다.

생체내 실험 결과 체중변화는 4일간 모든 군에서 체중이 증가하였으며 정상군의 체중증가량에 비해 대조군, 용담초 처치군의 체중증가량이 적었으며 대조군의 체중증가량보다 용담초 처치군의 경우가 높았다. 그러나 세 군 모두에서 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이는 알코올 섭취군이 정상군에 비해 체중증가량이 유의성 있게 높았던 이[39]의 보고와는 다른 경향이나, 4주까지는 체중증가량의 변화를 보이지 않았던 최[40], 이[41], Schisler 등[42]의 보고와는 일치하는 결과이다. 4주까지는 ADH에 의해 대사된 알코올이 NADH와 ATP를 생산하여 체중 변화를 크게 일으키지 않은 것으로 사료되며, 만약 5주 이상 에탄올의 투여가 지속되었다면 MEOS를 위주로 한 대사를 통해 ATP 생산 없이 발열 반응을 일으키게 되고, 에탄올 투여 지속으로 인한 소화능력 감소와 위장 점막의 손상으로 인한 흡수능력 감소, 그리고 에너지 소비효율 감소 등의 원인으로 체

중증가량이 유의성 있게 감소하였을 것이다[40].

혈중 에탄올 농도 차이 측정에서는 4일간 정상군에 비해 대조군과 용담초 처치군에서 현저한 증가를 보였으나 대조군과 용담초 처치군의 유의한 차이는 나타나지 않았다. 알코올 유입에 따른 혈중 에탄올 농도 증가에 용담초 추출물이 유의한 영향을 미치지 않기 때문인 것으로 보인다.

해마 치상회 영역에서의 세포생성 변화 관찰에서는 BrdU 염색을 사용하였으며 BrdU-positive cell의 수가 많을수록 해마 치상회에서의 세포 생성이 활발함을 의미한다[43]. 실험 결과 BrdU-positive cell의 수는 정상군에 비해 대조군과 용담초 처치군에서 통계적으로 유의한 감소를 보여 에탄올에 의해 세포생성이 저해되었음을 보여주었다. 그리고 용담초 처치군에서는 대조군보다 BrdU-positive cell의 수가 많이 관찰되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이는 에탄올에 의한 세포생성 저해가 용담초 추출물 처치에 의해 방지되었으나 유의한 효과를 내지 못한 것으로 해석된다.

해마 치상회 영역에서의 세포사멸 변화 관찰에서는 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) 염색을 사용하였으며 TUNEL-positive cell의 수가 많을수록 해마 치상회에서 apoptosis가 일어난 세포의 수가 많음을 의미한다[44]. TUNEL-positive cell의 수는 정상군에 비해 대조군과 용담초 처치군에서 통계적으로 유의한 증가를 보여 에탄올에 의해 세포사멸이 증가되었음을 보여주었다. 그리고 용담초 처치군에서는 대조군보다 TUNEL-positive cell의 수가 적게 관찰되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이는 에탄올에 의한 신경세포 사멸 증가 경향이 용담초 추출물 처치에 의해 방지되었으나 유의한 효과를 내지 못했음을 의미한다.

시험관내 실험에서는 SK-N-MC cell이 사용되었으며, 이는 신경모세포종 환자에게서 확립된 세포주로서 두배수에 가까운 염색체 수를 가지는 세포와 세배수를 보이는 세포로 구성되어 있으며 길이가 긴 중앙곁중심절 염색체, 끝곁중심절 염색체, 작은 끝곁중심절 염색체를 가진 것으로 알려져 있다[45].

시험관내 실험 결과 세포의 생존률에 대한 에탄올의 독성은 에탄올의 농도에 따라 강해져, 에탄올을 처치하지 않은 군에 비해 에탄올을 처치했을 때 농도가 높을수록 세포의 생존률이 감소하였다. 그리고 100 mM의 에탄올만 처치한 군에 비해 용담초 추출물의 농도가 높을수록 독성을 억제하는 효과가 높은 경향을 나타내, 100 ㎍/㎖의 용담초 처치군에서는 100 mM 에탄올 처치군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 이는 100 mM 에탄올을 처치했을 때 100 ㎍/㎖ 이상의 용담초를 처치할 때 통계적으로 유의한 수준의 에탄올 독성 억제 효과가 있음을 알 수 있다.

세포 생성 변화 관찰에서는 에탄올의 농도가 높을수록 SK-N-MC cell의 생성이 감소하였고, 100 mM 에탄올 처치군에 용담초의 처치 농도가 높을수록 세포생성이 증가하였으며 그중 100 ㎍/㎖의 용담초 처치군에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다. 이는 에탄올 처치에 의한 세포생성 억제 경향을 용담초 추출물이 방지할 수 있음을 보여주는 것이며, 처치된 용담초 추출물의 농도가 높을수록 효과가 증가하고, 특히 100 ㎍/㎖의 용담초 처치가 통계적으로 유의한 수준으로 세포생성 억제를 방지하는 효과가 있다고 해석된다.

DNA 분절화현상 실험에서는 SK-N-MC cell에 100 mM의 에탄올을 처치한 군에서 apoptosis

특유의 ladder 형태가 잘 관찰되었으며 100 mM의 에탄올 처치와 함께 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖의 용담초 추출물을 처치한 군에서 농도가 높을수록 ladder 형태가 감소함을 관찰할 수 있었다. 이는 에탄올에 의해 세포사멸이 증가되었고 처치된 용담초의 농도가 높을수록 세포사멸 증가가 방지되는 효과가 강해짐을 나타낸다.

Caspase-3 enzyme assay를 이용한 세포 사멸 변화 관찰에서는 caspase-3 친화성 기질에서 유리된 pNA의 양을 측정하는 방법을 통해 caspase-3의 활성을 간접적으로 측정하였으며, 100 mM의 에탄올을 처치한 군보다 10 ㎍/㎖의 용담초 추출물을 처치한 군에서는 오히려 pNA의 근소한 증가를 보였고 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖의 용담초 추출물 처치군에서는 농도가 증가할수록 pNA의 양이 감소하였으며, 에탄올 처지군과 농도별 용담초 처치군에서의 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이는 용담초 처치가 농도가 높을수록 세포사멸 증가를 방지하는 효과가 있으나 각 농도에서 통계적으로 유의한 수준에 이르지 못함을 나타낸다.

시험관내 실험 결과 에탄올 독성에 의한 세포 생성 저해와 세포사멸 가중에 대해, 처치한 용담초 추출물의 농도가 높을수록 에탄올 독성의 영향을 줄일 수 있었고, 일정 농도 이상의 용담초 추출물을 처치했을 때는 통계적으로도 유의한 정도의 독성 방지효과를 낼 수 있었다.

이상의 연구결과를 통해 용담초 추출물은 급성 알코올 중독으로 인한 어린 흰쥐 해마 치상회에서의 신경세포 신생 억제와 세포 사멸 증가를 방지할 수 있다는 것을 알 수 있다. 그리고 시험관내 실험 결과로 보아 일정 농도 이상의 용담초 추출물이 처치되었을 때 통계적으로 유의한 정도의 효과를 낼 수 있는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 생체내 실험에서 용담초 추출물의 효능이 통계적으로 유의한 정도까지 나타나지 않았는데 추후 용담초 추출물 처치 농도의 변경 등을 고려하여 보완한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

용담초 추출물이 급성 알코올 중독 흰쥐의 해마 치상회에서 신경세포 생성과 세포 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생체내 실험으로 체중, 혈중알코올농도, 세포신생정도, 세포사멸정도의 변화를 측정하고 시험관내 실험으로 세포 생존률, 세포신생정도, 세포사멸정도의 변화를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 생체내 실험에서, 알코올로 유발된 세포신생 억제, 세포사멸 증가를 용담초 추출물 처치를 통해 완화하는 결과를 보였지만 통계적으로 유의한 수치에 이르지 못하였다.
2. 시험관내 실험에서, 알코올로 유발된 세포생존률 저하에 처치한 용담초 농도가 높을수록 알코올 독성을 억제하는 효과가 높았고, 100 ㎍/㎖의 용담초 처치군에서 통계적으로 유의한 효과를 나타내었다.
3. 시험관내 실험에서, 알코올로 유발된 세포신생 억제에 처치한 용담초 농도가 높을수록 알코올 독성을 억제하는 효과가 높았고, 100 ㎍/㎖의 용담초 처치군에서 통계적으로 유의한 효과를 나타내었다.
4. DNA 분절화현상 실험에서 알코올로 유발된 세포사멸 증가 경향에 대해, 처치한 용담초 농도가 높을수록 세포사멸 증가의 방지 효과가 강해지는 경향을 보였다.

5. Caspase-3 enzyme assay를 이용한 세포 사멸 변화 관찰에서 알코올에 의해 세포사멸이 증가했으며 이에 대해 처치한 용담초 농도가 높을수록 세포사멸 증가의 방지 효과가 강해지는 경향을 보였으나, 각 농도에서 통계적으로 유의한 수준에 이르지 못하였다.

이상의 연구결과로 보아 용담초가 급성알코올 중독으로 인한 중추신경계 손상의 방지에 효과적으로 응용될 수 있으며, 용담초의 처치량에 따라 높은 효과를 낼 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 2006:32, 39-40, 447-50.
2. John Kerr, Clay Winterford, Brian Harmon. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer. 2006;73(8):2013-26.
3. Bergman H, Borg S, Hindmarsh T, Idestrom CM, Mutzell S. Computed-tomography of the brain and neuropsychological assessement of alcoholic patients. Advances in Experimental Medicine and Biology. 1980;126:771-86.
4. Fulton Crews, Leslie Morrow, Hugh Criswell, George Breese. Effects of ethanol on ion channels. International Review of Neurobiology. 1996;39:283-367.
5. Alling C, Bergman O, Larsson C, Simonsson P. Evaluation of ethanol effects on PLC signal transduction pathways using cell lines of neuronal origin. Alcohol and Alcoholism. 1993;2:295-9.
6. 권재철. 급속한 알코올 투여 후 흰쥐 뇌의 유전자 발현변화 분석. 경상대학교 대학원. 2003.
7. 유병규, 김경미, 김창주. 흰쥐 해마의 치상회에서 압박자극 적용이 뇌 신경세포 증식에 미치는 영향. 대한감각통합치료학회지. 2004;2(1):1-12.
8. 김현중, 김이화, 이은용. 대금음자(對金飮子) 약침이 알코올 독성 흰쥐의 해마에서 신경세포생성과 NOS 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2006;23(5):187-98.
9. 신민철, 김이화, 김연희. 인삼이 흰쥐의 치상회에서 알코올에 의한 새로운 신경세포 생성 및 nitric oxide synthase 발현에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(3):26-32.
10. Daniel Bonthius, Justin Woodhouse, Nancy Bonthius, Derek Taggard, Eric Lothman. Reduced seizure threshold and hippocampal cell loss in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2001;25(1):70-82.
11. 한경승. 해주기갈탕, 단주환 및 성주청간탕이 실험적 Alcoholism에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1992.
12. 곽익훈, 김종대, 정지천, 신억섭. 淸肝散이 急性 Ethanol 中毒에 흰쥐의 肝損傷에 미치는 影響. 한국한의학연구원논문집. 1996;2(1):177-91.
13. 공경환. Alcohol, Indomethacin 및 Burn-stress로 유발된 생쥐의 위점막 손상에 대한 대금음자, 익위탕, 시호소간산의 효과. 대한한의학회지. 2007;28(2):166-84.
14. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기:집문당. 2007:35-42, 235-40, 339-45.
15. 李東垣. 東垣醫集. 北京:人民衛生出版社. 1996:117-23.

16. 중약대사전 편찬위원회. 중약대사전. 서울:정담. 1997:3176-81.
17. 강병수, 고운채, 김규열, 김선희, 김인락, 김호철, 노승현, 박용기, 서부일, 서영배, 안호준, 신민교, 안덕균, 이체희, 이상인, 이영종, 조수인, 주영승, 최호영. 본초학. 서울:영림사. 2000:184-5.
18. 김미선, 김상찬, 지선영, 황순이, 조원준, 이종록, 박숙자. 용담초(龍膽草) 추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 pro-inflammatory meiator에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2008;21(2):28-38.
19. 박동석, 문성호, 안병철. 농도별 초룡담(草龍膽) 수침이 담석 유발 생쥐에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1991;8(1):141-56.
20. 황의완, 김지혁. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1987:427-41.
21. 우홍정, 이장훈, 김영철, 강병기, 김강산, 강윤호, 김종호, 조종관, 손창규, 박재현, 김동우, 고흥, 홍상훈, 강재춘, 김희철. 간계내과학. 서울:동양의학연구원출판사. 2001:304-14.
22. Michael Aminoff. Neurology and General Medicine, 3rd ed. New York:Churchill Livingstone. 2001:617-29.
23. Paul Perry, Tami Argo, Mitchell Barnett, Jill Liesveld, Barry Liskow, Jillian Hernan, Michael Trnka, Mary Brabson. The association of alcohol-induced blackouts and grayouts to blood alcohol concentrations. Journal of Forensic Sciences. 2006;51(4):896-9.
24. Aaron White. What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. Alcohol Research and Health. 2003;27:186-96.
25. 김세훈, 장석종, 박해근. 에타놀 정맥투여 고양이의 뇌압 변화에 관한 연구. 충남의대잡지. 1987;14(2):71-8.
26. Judson Chandler, Hunter Newsom, Colin Sumners, Fulton Crews. Chronic ethanol exposure potentiates NMDA excitotoxicity in cerebral cortical neurons. Journal of Neurochemistry. 1993;60(4):1578-81.
27. 장형석. 알코올이 미성숙 생쥐 뇌에 미치는 영향. 한양대학교 대학원. 2007.
28. Frank Netter. CIBA 원색도해의학총서-Nervous System Ⅰ. 서울:정담. 2000:27-8.
29. Joseph Altman, Gopal Das. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. The Journal of Comparative Neurology. 1965;124:319-35.
30. Maryellen Eckenhoff, Pasko Rakic. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. Journal of Neuroscience. 1988;8(8):2729-47.
31. Fred Gage, Gerd Kempermann, Theo Palmer, Daniel Peterson, Jasodhara Ray. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. Journal of Neurobiology. 1998;36:249-66.
32. 배병철 주해. 黃帝內經讀解. 서울:성보사. 2000:213, 658.
33. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:1135-9.
34. 김용훈, 김인락, 지규용. 정신기능소재로서의 뇌에 대한 한의학적 해석근거 연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(5):881-7.
35. 오은기. 알코올 농도에 따른 주상치료 처방의 선택에 관한 문헌 연구:동의보감 수록 처방을 중심으로. 상지대학교 대학원. 2008.
36. 김주곤, 서부일, 최선미, 최홍. 韓茵薩蒿湯이 알코올 투여로 유발된 흰쥐의 고지혈증과 간 손상의 예방에 미치는 영향. 대한본초학

회지. 2005;20(1):9-17.
37. 서지원. 용담초 추출물의 분리와 항산화 효과. 원광대학교 대학원. 2008.
38. 한상원. 용담초(龍膽草)및 시호수침(柴胡水鍼)이 CCl_4로 유발된 흰쥐의 손상간에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1993;10(1):297-313.
39. 이민정. 알코올을 섭취한 흰쥐에 있어서 생맥산이 간 보호작용과 지질대사에 미치는 영향. 건국대학교 대학원. 2001.
40. 최현숙. 달래가 에탄올을 투여한 흰쥐의 간독성에 미치는 항산화 효과. 조선대학교 대학원. 2002.
41. 이은경. 랫드의 알코올성 간 손상에 대한 2-Methylaminoethyl-4,4′-dimethoxy-5,6,5′,6′-dimethylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid-2′-carboxylate monohydrochloride의 보호효과. 부산대학교 대학원. 2004.
42. Nicholas Schisler, Shiva Singh. Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals. Free Radical Biology and Medicine. 1989;7(2):117-23.
43. N. Kee, S. Sivalingam, R. Boonstra, J. M. Wojtowicz. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. Journal of Neuroscience Methods. 2002;115(1):97-105.
44. Francoise Labat-Moleur, Christiane Guillermet, Philippe Lorimier, Catherine Robert, Sylvie Lantuejoul, Elisabeth Brambilla, Adrien Negoescu. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1998;46:327-34.
45. Robert Ross, Barbara Spengler, June Biedler. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. Journal of the National Cancer Institute. 1983;71(4):741-7.